



**European Patent Office**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
84

(11)

(12)

**(43) Veröffentlichungstag:**

26.02.1997 Patentblatt 1997/09

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: G01N 27/416, G01N 27/30

**(21) Anmeldenummer: 96113118.2**

(22) Anmeldetag: 15.08.1996

**(84) Benannte Vertragsstaaten:**

DE ES FR GB IT

(30) Priorität: 18.08.1995 DE 19530376

(71) Anmelder: Fresenius AG

**D-61350 Bad Homburg v.d.H (DE)**

(72) Erfinder:

- **Abel, Petra**  
61169 Friedberg (DE)
- **Allendörfer, Wolfgang**  
61352 Bad Homburg (DE)

(74) Vertreter: Fuchs, Luderschmidt & Partner

**Abraham-Lincoln-Strasse 7**

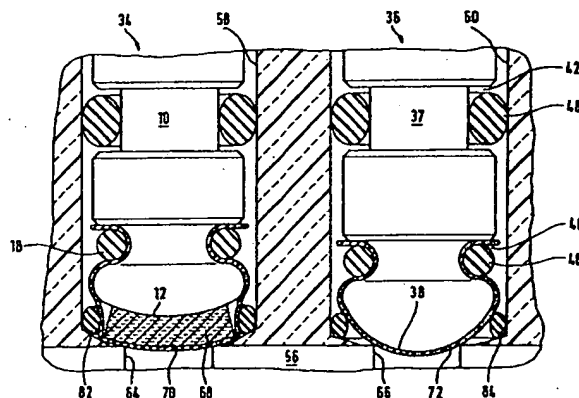
65189 Wiesbaden (DE)

**(54) Amperometrischer Biosensor**

(57) Biosensor für die Amperometrie bei der die Meßelektrode (34) aus einem elektrisch leitenden Träger aus Kohlenstoff besteht, der mit einem Platinmetall in kolloider Form einheitlich gefüllt ist, wobei von der Meßelektrode (34) ein Ableitkontakt (10) aus Glaskohlenstoff abgeht.

Der poröse Träger (68) ist mit einem Enzym, beispielsweise Glukoseoxidase zur Bestimmung von Glukose, gefüllt, wobei die Oberfläche des Trägers (68) mit einer Membran (70) gegenüber der Umgebung abgedeckt ist.

**Fig. 3**



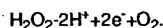
**EP 0 759 553 A1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Biosensor Zur amperometrischen Bestimmung eines in einer wässrigen Lösung, insbesondere Blut, gelösten Substrats mit einem Enzym zur Umsetzung des Substrats, einer Meßelektrode, deren Oberfläche sich für eine Bedoxreaktion der Substratumsetzungsprodukte eignet, und die einen elektrisch leitenden Träger aus Kohlenstoff und ein auf den elektrisch leitenden Träger aufgebracht

Metall der 8. Nebengruppe aufweist, wobei der elektrisch leitende Träger mit einer das Enzym enthaltenden Lösung getränkt ist, einer semipermeablen Membran, die die Meßelektrode einschließlich des elektrisch leitenden Trägers dicht umschließt, und einem Ableitkontakt, der von dem elektrisch leitenden Träger abgeht.

Biosensoren dienen zur Bestimmung eines Substrats, das mit Hilfe des im Biosensor vorgesehenen Enzyms in ein Umsetzungsprodukt katalytisch umgesetzt wird, das der Biosensor qualitativ und quantitativ bestimmen kann. Solche Enzymelektroden werden üblicherweise zur Bestimmung der Glukose in Blut eingesetzt, bei denen als Enzym Glukoseoxidase eingesetzt wird, mit deren Hilfe Glukose katalytisch in Glukonolaktone/Glukonsäure und  $H_2O_2$  umgesetzt wird. Bei der Amperometrie wird dann das Wasserstoffperoxid oxidiert nach folgender Gleichung:



Die an der Elektrode freigesetzten Elektronen werden als Oxidationsstrom abgeführt und sind in einem bestimmten Bereich proportional zur Glukosekonzentration.

Das vorstehende genannte Glukose-Biosensorsystem läßt sich ohne weiteres auf andere Systeme übertragen, beispielsweise auf das System Alkohol/Alkoholoxidase, Laktat/ Laktatoxidase, Harnsäure/ Urikase, Wasserstoffperoxid/Katalase und dergleichen.

Die üblicherweise eingesetzten Arbeitselektroden, die ein Enzym als Katalysator für die Umsetzung eines in Wasser gelösten Substrats aufweisen, arbeiten bei Referenzspannungen von 600 mV und mehr, was jedoch bei sämtlichen Meßsystemen bisher zu unerwünschten Korrosionen und anderen unerwünschten Nebenreaktionen geführt hat. Insofern wurde bereits versucht, diese Referenzspannung herabzusetzen, indem das Substraterzeugnisprodukt ebenfalls mit Hilfe eines Katalysators in dessen Folgeprodukt umgewandelt wird, wie dies vorstehend in der Umsetzungsgezeigt ist.

In der GB-PS 2,191,003 (EP 0 247 850) ist ein Biosensor in Form einer Enzymelektrode beschrieben, die in der Arbeitselektrode ein Metall der Platingruppe einsetzt. Um eine möglichst große Umsetzungsfläche zu erreichen, ist das Platinmetall in kolloider Form einheitlich verteilt auf einem elektrisch leitenden Träger vorgesehen. Dieses Trägermaterial liegt ebenfalls fein verteilt

vor, üblicherweise als Kohlenstoffpulver, das mit Hilfe eines wasserabweisenden Bindemittelharzes verfestigt ist.

Eine derartig hergestellte Arbeitselektrode verfügt über hohe Stromdichten pro Flächeneinheit und weist üblicherweise eine Betriebsspannung von 300 - 350 mV gegenüber den vorstehend genannten Spannungen von 600 - 700 mV auf.

Auf dieser porösen Arbeitselektrode ist das Enzym entweder adsorbiert oder aber kovalent gebunden vorgesehen, wobei die Frontfläche der Arbeitselektrode mit einer porösen Membran abgedeckt sein kann, die gegenüber den zu bestimmenden Enzymsubstrat durchlässig ist.

Von dieser bekannten Arbeitselektrode gehen elektrische Kontakte, wie Platin, Silber und dergleichen ab. Es hat sich nun herausgestellt, daß selbst ein elektrischer Kontakt aus dem üblicherweise eingesetzten Platin dem Biosensor keine lange Lebensdauer (maximal 1 Monat) garantiert, da er nach Ablauf dieser Periode korrodiert ist, so daß die gesamte Elektrode ausgetauscht werden muß. Auch andere Materialien, wie Gold oder Kupfer, haben sich bei dieser Elektrode als nicht einsetzbar erwiesen, da sie innerhalb weniger Wochen korrodiert waren.

Ähnliche Elektrodenanordnungen sind in der EP- 470 290, EP- 136 362, EP-127 958, EP- 197 747, EP- 48 090, EP- 359 831, US 4 655 880, US 4 950 379, PCT-WO 89/05454, DD 297 713 oder US 52 27 042 beschrieben.

So weist die Arbeitselektrode gemäß EP 0 470 290 Glaskohlenstoff als Sensormaterial auf, das unmittelbar mit der Enzymschicht verbunden ist. Da es sich hier um keinen katalytisch wirksamen Sensor handelt, treten unterhalb einer Arbeitsspannung von 600 mV keine Effekte bei einer Glukose/ Glukoseoxidase - Elektrodenanordnung auf, so daß auch dort die eingangs erwähnten unerwünschten Spannungen auftreten.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, die eingangs erwähnte Elektrodenanordnung so zu verbessern, daß sie bei möglichst niedriger Arbeitsspannung, d. h. unterhalb 500 mV arbeitet und darüber hinaus langzeitstabil ist, also keine Korrosionseffekte zeigt.

Die Lösung der Aufgabe gelingt dadurch, daß der Ableitkontakt aus Glaskohlenstoff besteht.

Der Einsatz von Glaskohlenstoff, der mit der Arbeitselektrode elektrisch leitend verbunden ist, hat zunächst den Vorteil, daß die Elektrode keinerlei Korrosionserscheinungen während der Lebensdauer der Elektrode unterzogen wird, die praktisch nur durch die Enzymaktivität bestimmt wird. Die Lebensdauer des Enzyms liegt üblicherweise bei 4 - 6 Monaten, also einer Zeitperiode, bei der sich keinerlei korrosive Veränderungen an der Glaskohlenstoffoberfläche zeigen. Es treten nur minimale oder gar keine Störpotentiale oder -spannungen an der Elektrode auf, so daß das gesamte Meßverfahren hierdurch erheblich vereinfacht wird. Dies führt dazu, daß mit der erfindungsgemäßen Elek-

trode direkt Messungen in unverdünnten Vollblut möglich sind, was unter anderem an Dauermessungen mit Humanblut nachvollzogen worden ist. Neben Vollblut können jedoch auch andere wässrige Körperflüssigkeiten, wie Serum, Plasma, Urin, Speichel, Dialyseflüssigkeiten, Elektrolytlösungen und dergleichen mehr auf das zu untersuchende Substrat, das in einer derartigen Lösung enthalten ist, mit dem erfindungsgemäßen Sensor untersucht werden.

Der erfindungsgemäße Biosensor wird vorteilhafterweise zur Bestimmung von Glukose eingesetzt, wobei als Enzym in diesem Fall Glukoseoxidase (GOD) zum Einsatz kommt. Jedoch können auch andere Oxidoreduktasen eingesetzt werden, zu denen beispielsweise Laktatoxidase, Cholesterinoxidase, Galaktoseoxidase sowie andere Peroxid produzierende Enzyme und Kombinationen solcher Enzyme gehören. Auf die bereits vorstehend erwähnten Substrat/Oxidasesysteme wird ebenfalls Bezug genommen (Harnsäure/ Urikase; Ascorbinsäure/ Ascorbatoxidase; Pyruvat/Pyruvatoxidase).

Die einsetzbaren Enzyme können entweder an dem elektrisch leitenden Trägermaterial adsorbiert werden oder aber unmittelbar mittels einer chemischen Reaktion kovalent an diesen Träger gebunden, d. h. immobilisiert werden.

Was zunächst den Träger selbst betrifft, so wird auf die vorstehend genannte EP 0 247 850 aus Offenbarungsgründen Bezug genommen, deren Inhalt zum Gegenstand dieser Anmeldung gemacht wird.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Trägermaterial besteht aus einer porösen Schicht kohlenstoffhaltiger Partikel, die untereinander mit einem Harz-Bindemittel gebunden sind. Die Größe dieser Partikel beträgt bis zu 50 nm.

Die Partikel selbst weisen ein Kohlenstoff- oder Graphitpulver auf, das eine hohe Dichte funktioneller Gruppen (Carboxylate, amino- und schwefelenthaltende Gruppen) auf der Oberfläche aufweisen kann. Dieses Pulver kann auf Grund seiner großen Oberfläche sehr leicht die vorstehend genannten eingesetzten Enzyme binden.

Auf diesem Pulver wird vorteilhafterweise vor dessen Kompatieren mit Hilfe eines Bindemittels das Metall der 8. Nebengruppe in kolloider Suspension bis zu 20 Gewichtsprozent bezogen auf den Kohlenstoffträger aufgetragen, so daß sich eine einheitliche Verteilung des Platins oder Palladiums als Metall der Platingruppe vorteilhafterweise in den Kohlenstoffträger ergibt. Nach dem Vermischen mit dem platinhaltigen Material wird der Kohlenstoffträger mit einem üblicherweise wasserabstoßenden Harzbindemittel vermischt und in eine vorbestimmte Form überführt. Vorteilhafterweise werden fluorhaltige Harze, beispielsweise auf der Basis von PTFE als harzhaltige Bindemittel eingesetzt, wie dies in der vorstehend genannten EP-Schrift erläutert ist, worauf Bezug genommen wird. Dieses Bindemittel liegt in einer Menge bis zu 70 Gewichtsprozent vor, wobei dessen Gewichtsanteil üblicherweise nicht kritisch ist.

Das Bindemittel soll dabei eine minimale Sauerstoffdurchlässigkeit unter atmosphärischen Bedingungen, wenigstens  $2 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{cm}^2$  bezogen auf das Polymer, haben.

Desweiteren soll die Partikelgröße des kolloidalen Platin-Metalls in einem Bereich von etwa 1 - 3 nm liegen, das an die Oberfläche des Kohlenstoffpulver adsorbiert ist.

Vorteilhafterweise kann das elektrisch leitende Trägergemisch mit dem Platinmetall in eine Folie geformt werden, die vorteilhafterweise auf einer Kohlenstoffolie als Trägermaterial fixiert ist.

Bevorzugte Enzymelektrodensubstrate werden unter der Bezeichnung PACE von der Firma E-TEK vertrieben und werden üblicherweise als elektro-katalytische Gasdiffusionsselektroden in Brennstoffzellen eingesetzt.

Wie vorstehend erwähnt, kann das Enzym am Träger adsorbiert oder aber unmittelbar immobilisiert werden. Erfindungsgemäß ist die Adsorption eines Enzyms dann bevorzugt, wenn die Oberfläche des so behandelten Trägers mit einer mikroporösen, semipermeablen Membran gegenüber dem wässrigen Meßgut geschützt ist. Andererseits kann natürlich das Enzym durch eine Immobilisierungsbehandlung physikalischer oder chemischer Natur so fest an dem Träger haften, daß ein derartiger Schutz durch eine Membran nicht notwendig ist.

Bei der reinen Adsorption wird das Enzym in einer wässrigen Lösung oder Suspension vorgelegt, wobei diese Lösung auf den porösen Träger aufgetragen wird. Eine derart mit Enzym beschichtete Folie wird dann mit dem nachstehend erläuterten Ableitkontakt verbunden.

Andererseits kann das Enzym auf der Oberfläche des Trägers nach bekannten Immobilisierungstechniken, beispielsweise durch kovalente Bindung mit Carbo-diimid oder Glutaraldehyd verbunden werden, wie dies in der vorstehenden EP-Schrift erläutert ist, worauf wiederum Bezug genommen wird.

Der elektrische Ableitkörper oder -kontakt besteht aus Glaskohlenstoff, der durch Pyrolyse von Polymeren mit dreidimensionaler vernetzter Struktur gebildet wird. Im Makrobereich hat glashaltiger Kohlenstoff praktisch keine Poren besitzt jedoch in seinen Schichten zahlreich Hohlräume. Er ist außerordentlich korrosionsbeständig gegen Säuren und Alkalien sowie Schmelzen und wird erst oberhalb von etwa 550°C durch Sauerstoff bzw. oxidierende Schmelzen angegriffen.

Weitere Einzelheiten zu Glaskohlenstoff sind in der Zeitschrift für Werkstofftechnik 15 (1984) Seite 331 - 338 beschrieben, worauf Bezug genommen wird. Erfindungsgemäß einsetzbare Glaskohlenstoffe werden in Form von platt-, ring-, stäbchen- und scheibenförmigen Elektroden für die chemische Analytik vertrieben. Darüberhinaus läßt sich die Oberfläche des Glaskohlenstoffs mechanisch bearbeiten, beispielsweise lassen sich Ringnuten und Bohrungen in zylindrische Körper einarbeiten.

Sofern erwünscht, kann die Oberflächenstruktur

von Glaskohlenstoff durch Behandlung bei erhöhten Temperaturen, beispielsweise etwa 500°C, oder chemisch durch Einwirken von Salpetersäure aktiviert werden.

Erfindungsgemäß wird speziell für die Gegenelektrode im erfindungsgemäßen Meßverfahren aktivierte Glaskohlenstoff eingesetzt, während der Ableitkontakt der Arbeitselektrode aus üblicherweise nicht aktiviertem Glaskohlenstoff besteht.

Bei der Arbeitselektrode wird als Ableitkontakt ein stäbchenförmiger oder zylinderförmiger Körper eingesetzt, dessen Frontteil als Träger für den elektrisch leitenden Träger der Platinmetallelektrode dient. Sie nimmt weiterhin an ihrem rückwärtigen Ende einen Ableitdraht auf, der vorteilhafterweise in eine Axialbohrung des Glaskohlenstoffkörpers feststehend und elektrisch leitend eingeführt ist.

Die erfindungsgemäße Arbeitselektrode wird vorteilhafterweise in Durchflußmeßzellen in Form einer 2- oder 3-Elektrodenanordnung eingesetzt.

Bei der 2-Elektrodenanordnung dient die Gegenelektrode zugleich auch als Bezugsselektrode, während bei der 3-Elektrodenanordnung neben der Gegenelektrode eine Bezugsselektrode vorliegt.

Bevorzugt ist bei der erfindungsgemäßen Meßzelle eine 3-Elektrodenanordnung, die neben der erfindungsgemäßen Meßelektrode eine Ag/AgCl-Elektrode als Bezugsselektrode und eine Gegenelektrode aus aktiviertem Glaskohlenstoff enthält.

Desweiteren können Sensoren für die Temperaturmessung oder weitere Elektroden zur Korrektur von Störstoffen, wie Rinderserumalbumin - Hilfselektroden eingesetzt werden.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Es zeigen

- Figur 1 die Seitenansicht eines Glaskohlenstoffstiftes der Arbeitselektrode, teilweise aufgerissen, im Bereich des Kontaktstiftes;  
 Figur 2 eine Meßzelle mit 3 Elektroden, wobei die Arbeitselektrode und Meßelektrode im Querschnitt und im Aufriß gezeigt sind;  
 Figur 3 eine vergrößerte Darstellung des Detail A von Figur 2, wobei die Meßelektrode und die Referenzelektrode geschnitten dargestellt sind; und  
 Figur 4 einen Schnitt durch die Meßzelle von Figur 2 entlang der Linie IV-IV, wobei lediglich die Gegenelektrode eingesetzt ist.

Aus Figur 1 ist der Elektrodenkörper 10 aus Glaskohlenstoff ersichtlich, der im wesentlichen eine zylinderförmige Struktur aufweist. Das Frontteil 12 des Elektrodenkörpers 10 ist gemäß der in Figur 1 gezeigten Ausführungsform nach außen gewölbt ausgebildet, was - wie speziell bei der Meßzelle gemäß Figur 2 nachstehend erläutert wird - die Anströmung der zu untersuchenden Lösung begünstigt. Benachbart zu dieser Wölbung 14 ist eine erste Ringnut 16 im Elektroden-

körper vorgesehen, in die ein erster O-Ring 18, wie aus Figur 3 ersichtlich ist, eingelegt werden kann.

Im Anschluß an diese erste Ringnut sind weitere Ringnuten 20 und 22 über den Elektrodenkörper verteilt vorgesehen, in die weitere O-Ringe 24 und 26 eingelegt werden können.

Am rückwärtigen Ende des zylinderförmigen Elektrodenkörpers 10 ist vorteilhafterweise ein zylinderförmiger Absatz 28 vorgesehen, der gegenüber dem Elektrodenkörper 10 einen geringeren Durchmesser aufweist.

Desweiteren ist von der Rückseite her eine axiale Bohrung 30 im Elektrodenkörper 10 vorgesehen, innerhalb der ein Kontaktstift 32 elektrisch leitend vorgesehen ist, beispielsweise mit Hilfe eines elektrisch leitenden Klebers.

Wie ebenfalls auf Figur 3 ersichtlich ist, unterscheiden sich die Elektrodenkörper 10 der Meßelektrode 34 und der Bezugsselektrode 36 in ihrer Struktur nur dadurch, daß die Wölbung der Bezugsselektrode 36 in ihrem Frontbereich 38 stärker ausgebildet ist.

Die Referenzelektrode besteht jedoch nicht - wie vorstehend erwähnt - aus Kohlenstoff, sondern aus einem Silber/Silberchlorid-Stift, der die entsprechenden Ringnuten 40 - 44 und O-Ringe 46 - 50 aufweist.

Gemäß Figuren 2 und 3 ist eine Meßzelle 52 dargestellt, die aus einem Elektrodenblock 54, üblicherweise aus einem transparenten Kunststoffmaterial, wie Acrylglas, besteht, der einen Meßkanal 56 aufweist, der sich quer durch den Elektrodenblock 54 erstreckt. Senkrecht von oben sind erste, zweite und dritte Bohrungen im Elektrodenblock 54 vorgesehen, von denen die erste und die zweite Bohrung 58, 60 bis zum Meßkanal 56 geführt sind, wobei die Durchgangsöffnung 64 bzw. 66 der ersten Bohrung 58 bzw. der zweiten Bohrung 60 zum Meßkanal 56 hin gegenüber dem Durchmesser dieser beiden Bohrungen 58 und 60 verengt ist, d. h. einen geringeren Durchmesser im Vergleich zum Bohrungsdurchmesser aufweist.

Dabei ist der Durchmesser der Bohrungen 58 und 60 so dimensioniert, daß dieser geringfügig größer ist als der Durchmesser des Elektrodenkörpers 10 der Meßelektrode 34 bzw. der Bezugsselektrode 36. Andererseits sind jedoch die Außendurchmesser der O-Ringe 24 und 26 bzw. 48 und 50 etwas größer als der Durchmesser der Bohrungen 58 und 60, so daß es hier zu einer radialen Dichtung zwischen O-Ring/Bohrungswand kommt.

Wie weiterhin aus Figur 3 ersichtlich ist, ist auf der Frontseite 12 der Arbeits- oder Meßelektrode 34 der vorstehend erwähnte elektrisch leitende Träger 68 mit einem Platinmetall vorgesehen, der weiterhin mit einer Enzym-Lösung getränkt ist. Soll Glukose, beispielsweise im Blut mit der Meßelektrode 34 bestimmt werden, so ist als Enzym Glukoseoxidase in dem Träger 68 vorgesehen, der aus einer mit kolloidalem Platin aktivierten Kohlenstoffolie besteht.

Um den Frontbereich 12 des Elektrodenkörpers 10 und den auf dem Frontbereich vorgesehenen Pace-Trä-

ger 68 ist eine semipermeable Membran 70 umhüllend angeordnet, die sich nach rückwärts bis über die erste Ringnut 16 hinaus erstreckt und vom O-Ring 18 in der Ringnut dicht gegenüber der Umgebung fixiert ist. Die in der Pace-Folie 68 vorgesehene Enzym-Lösung befindet sich innerhalb der Membran 70. Insofern ist die Glukoselösung in dem von der Membran 70 durch die Wirkung des O-Rings 18 gebildeten Raums dicht eingeschlossen und somit vor Einfüssen der Umgebung, insbesondere des zu messenden Guts, geschützt. Gleiches gilt für die Bezugselektrode 36, deren Frontbereich 38 ebenfalls von einer Membran 72 durch die Wirkung des O-Rings 46 geschützt ist.

Gemäß Figur 2 ist der Einbau der Meßelektrode 34 und 36 in den Elektrodenblock 54 ersichtlich. Wie bereits vorstehend erläutert, werden die Elektroden radial mit Hilfe der O-Ringe 24, 26 bzw. 48 und 50 innerhalb der Bohrungen 58 bzw. 60 dicht angeordnet und außerdem geführt. Desweiteren erfolgt eine axiale Spannung der Elektroden 34 und 36 gegen die Durchtrittsöffnungen 64 und 66 mit Hilfe von Federn 74 bzw. 76, die auf den rückwärtigen Bereich des Elektrodenkörpers 10 bzw. 37 drücken, wobei der Absatz 28 als Führung für die Feder 74 dient. Die Spannung der Federn 74 und 76 innerhalb der Bohrungen 48 und 60 erfolgt dabei über hohle Stopfen oder Schrauben 78 bzw. 80, wie diese ebenfalls auf Figur 2 ersichtlich ist. Um eine Beschädigung des Frontbereichs 12 bzw. 38 und der diesen Frontbereich 12, 38 überziehenden Membran 70 und 72 zu verhindern, ist jeweils in die Bohrung 60 und 62 benachbart zur Durchtrittsöffnung 64 und 66 jeweils ein O-Ring 82 und 84 eingelegt, gegen den sich der Außenrand des Frontbereichs 12, 38 dichtend federnd legt, wobei die Wölbungen der Frontseiten 14 und 38 in den Meßkanal 56 hineinragen, so daß durch die so erzielten, günstigen Anströmverhältnisse ein optimaler Probenkontakt erzielt wird. Durch die Vorwölbung in den Probenkanal kommt es zu einer totenzonenfreien Anordnung, so daß hierdurch eine besonders probenverschleppungsarme Probenbehandlung gegeben ist.

Gemäß Figur 4 ist lediglich die Gegenelektrode 86 dargestellt, die, wie in Verbindung mit der Darstellung von Figur 2 ersichtlich ist, zylinderförmig ausgebildet ist. Die Längsachse dieser Gegenelektrode 86 läuft parallel zur Längsachse des Meßkanals 56, der auf seiner Unterseite einen entsprechend langen Schlitz 88 aufweist, gegen den die Außenfläche der Gegenelektrode 86 mit Hilfe eines Federelements 90 gedrückt ist. Dieses Federelement ist mit einer Schraube 92 am Elektrodenblock 54 befestigt, in dem zum Zwecke der Befestigung eine senkrechte Bohrung 94 vorgesehen ist, innerhalb der die Schraube mittels eines in der Bohrung vorgesehenen Gewindes 96 befestigt ist. Sowohl das Federelement 90 als auch die Schraube 92 sind elektrisch leitend, wobei die Schraube 92 über einen Kontaktstift 98 nach außen an den Meßstromkreis angeschlossen werden kann.

Wie aus Figur 4 ersichtlich ist, wird Zu Montage-

zwecken die Gegenelektrode 86, das metallische Federelement 90 und Schraube 92 von der Unterseite des Elektrodenblocks 54 her in eine im wesentlichen rechteckige Öffnung 87 eingeführt, die nach der Montage mit einem Gießharz 100 verschlossen wird. Die Gegenelektrode 86 selbst besteht - wie vorstehend erläutert - vorteilhaft aus aktiviertem Glaskohlenstoff.

Wie aus Figur 2 weiterhin ersichtlich ist, ragen aus dem Elektrodenblock 2 weitere Kontaktstifte 102 und 104 heraus, die über elektrische Leitungen, von denen in Figur 2 nur die Leitung 106 (Meßelektrodenleitung) gezeigt ist, mit der Meßelektrode 34 bzw. der Bezugselektrode 36 verbunden sind. Die entsprechende Bohrung 108 für den Elektrodenstift 102 ist aus Figur 4 ersichtlich.

#### Beispiel 1

Eine mit kolloidalem Platin aktivierte Kohlenstoffolie wird mit einer Glukoseoxidase-Lösung deart betropft, daß die Folie etwa einen Glukoseoxidasegehalt von etwa 10 Enzymeinheiten je mm<sup>2</sup> aufweist. Anschließend wird diese Folie in der Elektrodenanordnung gemäß Figur 2 - 4 verwendet.

Diese Folie wird mit einer hydrophilen semipermeablen Membran umhüllt, wobei die Membran einen mittleren Porendurchmesser von etwa 30 nm besitzt. Durch den Meßkanal 56 werden unterschiedliche Glukosekonzentrationen in Wasser/Blut geführt, wobei sich folgende Strom-Spannungs-Kurve (Voltamogramm) ergibt. Der Diffusionsgrenzstrom liegt dabei für eine Glukosekonzentration von 20 mmol/l bei etwa 3 A. Es treten nur minimale oder keine Störpotentiale/Polarisation auf. Desgleichen wird auch während der mittleren Lebensdauer der Elektrode (etwa 6 Monate), die nur durch den Verbrauch des Enzyms bestimmt ist, keine Korrosion beobachtet. Auf Grund der minimalen Probenverschleppung und des optimalen Probenkontakts treten deutliche, störungsfreie Signale auf. Die Meßwerte sind genauer und reproduzierbarer als bei den bisher eingesetzten Elektroden (2-Elektroden-System vom Ag/Pt-Typ). Desgleichen ist die Linearität der Meßsignale bei unterschiedlichen Meßkonzentrationen verbessert und der Meßbereich selbst erweitert.

#### Vergleichsversuch 1

Anstelle von Glaskohlenstoff wird in der Meßelektrode Platin als Elektrodenkörper 10 zur Stromableitung benutzt.

Schon nach kurzer Zeit treten Korrosionseffekte durch die üblicherweise zusätzlich auftretenden Batteripotential auf.

#### Vergleichsversuch 2

Anstelle der platinieren Kohlenstoff-Folie (Pace) wird eine nur aus Kohlenstoff bestehende Folie, die also nicht platinieren ist, eingesetzt. Ansonsten wird wiederum

das Beispiel 1 wiederholt. Gegenüber den bei der Pace-Folie eintretenden Meßeffekten, zu deren Erzeugung ein Potential von etwa 330 mV anzulegen ist, tritt hier erst ein Meßeffekt bei etwa 845 mV auf, dabei ist die Messung begleitet von Elektrolyse-Störeffekten, so daß diese Elektrode nur bedingt eingesetzt werden kann.

#### Patentansprüche

1. Biosensor zur amperometrischen Bestimmung eines in einer wässrigen Lösung, insbesondere Blut, gelösten Substrats mit einem Enzym zur Umsetzung des Substrats, einer Meßelektrode (34), deren Oberfläche sich für eine Redoxreaktion der Substratumsetzungsprodukte eignet, und die einen elektrisch leitenden Träger aus Kohlenstoff (68) und ein auf den elektrisch leitenden Träger aufgebrachtes Metall der 8. Nebengruppe aufweist, wobei der elektrisch leitende Träger mit einer das Enzym enthaltenden Lösung getränkt ist, einer semipermeablen Membran, die die Meßelektrode einschließlich des elektrisch leitenden Trägers dicht umschließt, und einem Ableitkontakt (10), der von dem elektrisch leitenden Träger (68) abgeht, dadurch gekennzeichnet, daß der Ableitkontakt (10) aus Glaskohlenstoff besteht.
2. Biosensor nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß der Glaskohlenstoff aktiviert ist.
3. Biosensor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Ableitkontakt (10) ein Zylinderteil aufweist, auf dessen Frontseite die Arbeitselektrode angeordnet ist.
4. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Frontseite (12) nach außen gewölbt ist.
5. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß der zylinderförmige Elektrodenkörper auf seiner Oberfläche eine erste Ringnut (16) zur Aufnahme eines O-Rings (18) aufweist, mit dem die Membran (70) am Elektrodenkörper (10) fixierbar ist.
6. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß der zylinderförmige Elektrodenkörper weitere Ringnuten (20, 22) zur Aufnahme von weiteren O-Ringen (24, 26) aufweist, mit denen der Elektrodenkörper (10) gegen eine in einem Elektrodenblock (54) vorgesehene Bohrung (58) radial fixierbar ist.
7. Meßzelle (52), aufweisend den Biosensor nach Anspruch 1, eine Gegenelektrode und eine Bezugselektrode.
8. Meßzelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Meßkanal (56), eine erste Bohrung 58, in dem die Meßelektrode (34) gemäß Anspruch 1 angeordnet ist, und eine zweite Bohrung (60) aufweist, in der die Bezugselektrode (36) angeordnet ist, wobei die erste und zweite Bohrung (58) und (60) im wesentlichen senkrecht zum Meßkanal (56) angeordnet sind und in diesen münden, und die Gegenelektrode (86) zumindest einen Teil der Wand des Meßkanals (56) bildet.
9. Meßzelle nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Gegenelektrode (86) aus Glaskohlenstoff besteht, der vorzugsweise aktiviert ist, und zylinderförmig ausgebildet ist.
10. Meßzelle nach Anspruch 7 oder 8 gekennzeichnet durch eine Bezugselektrode (36) aus Silber/Silberchlorid.
11. Meßzelle nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Längsachse der Gegenelektrode (86) zur Längsachse des Meßkanals (56) im wesentlichen parallel ist und die Gegenelektrode (86) gegen einen am Meßkanal (56) angeordneten Schlitz (88), der im Elektrodenblock (54) vorgesehen ist, gedrückt ist.

Fig. 1

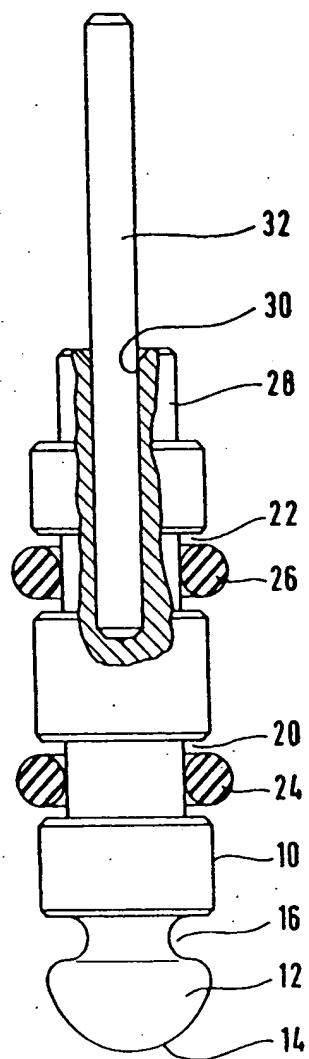


Fig. 2

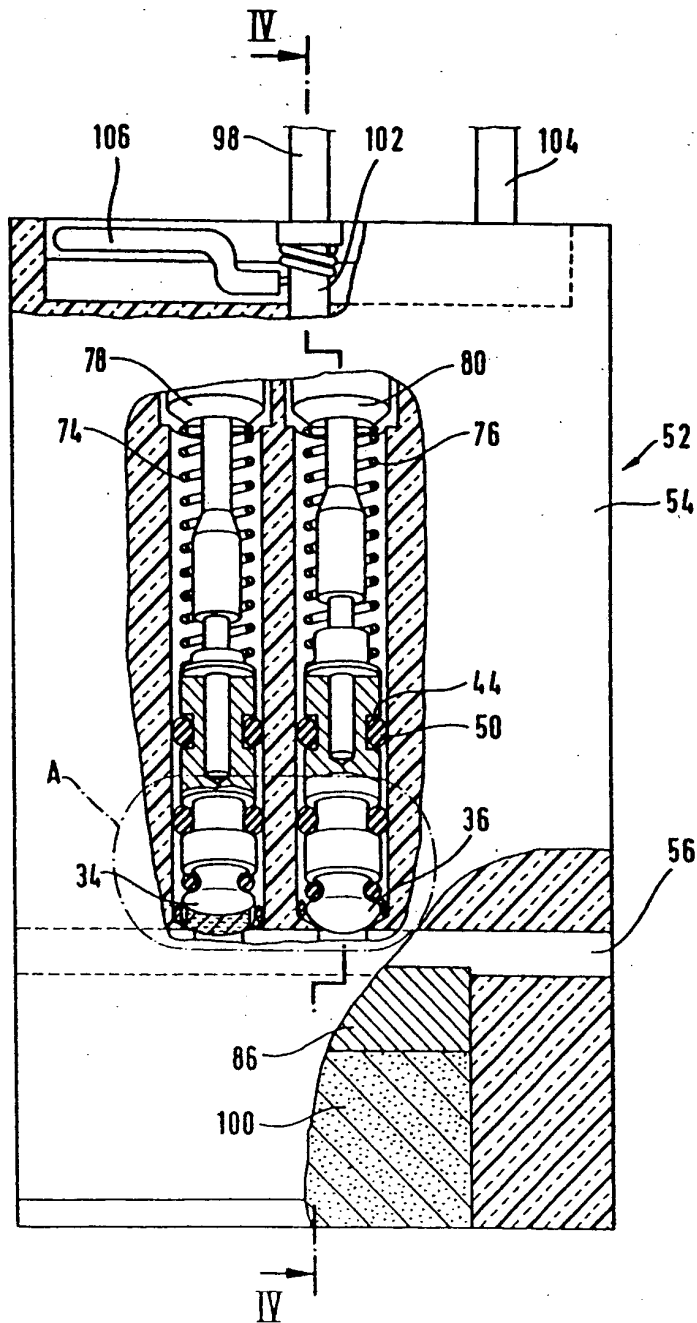




Fig. 3

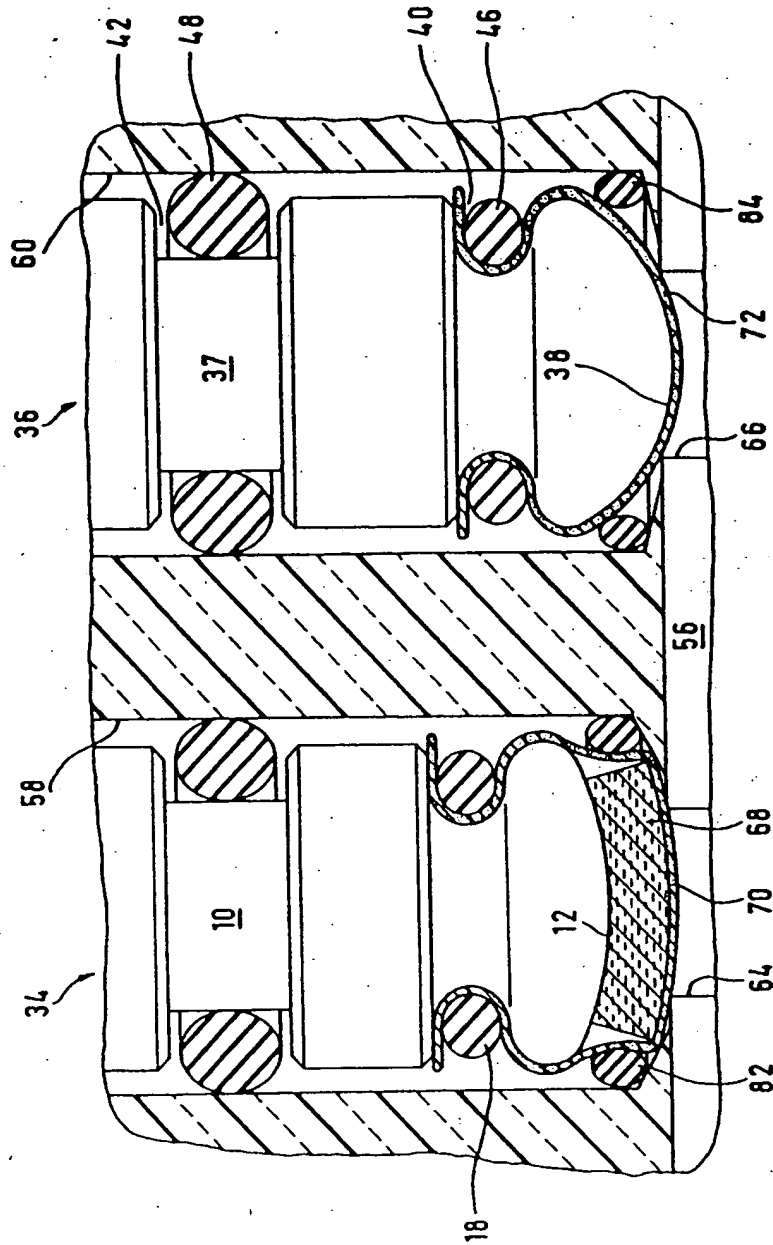
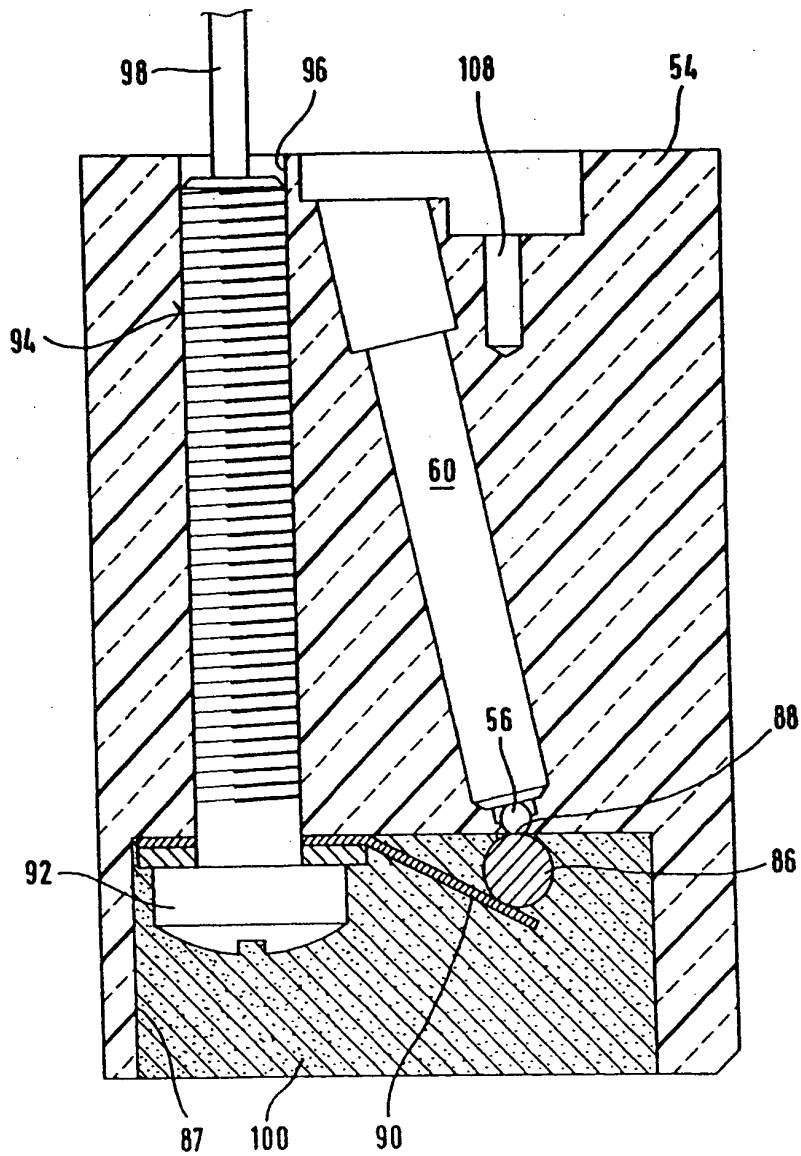


Fig. 4





Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 96 11 3118

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	US-A-5 227 042 (ZAWODZINSKI THOMAS A ET AL) 13.Juli 1993 * Spalte 2, Zeile 30 - Zeile 50; Ansprüche 1,3; Abbildungen 1A,,1B * * Spalte 3, Zeile 5 - Spalte 4, Zeile 25 *	1-11	G01N27/416 G01N27/30
A	EP-A-0 247 850 (CAMBRIDGE LIFE SCIENCES) 2.Dezember 1987 * Seite 5, Zeile 35 - Zeile 55; Ansprüche 1,7; Abbildungen 15,16 * * Seite 7, Zeile 5 - Zeile 20 * * Seite 12, Zeile 5 - Zeile 15 *	1-11	
A	US-A-5 286 364 (YACYNICH ALEXANDER M ET AL) 15.Februar 1994 * Spalte 6, Zeile 15 - Zeile 50; Abbildung 2 * * Spalte 14, Zeile 5 - Zeile 20 * * Spalte 15, Zeile 20 - Zeile 25 *	1-11	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 537 (P-968), 30.November 1989 & JP-A-01 221653 (SHIMADZU CORP), 5.September 1989, * Zusammenfassung *	1-11	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) G01N
A	US-A-4 950 379 (YOUNG CHUNG C ET AL) 21.August 1990 * Spalte 1, Zeile 60 - Spalte 2, Zeile 50; Abbildung 1 * * Spalte 3, Zeile 20 - Zeile 40 *	1-11	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 23.Oktober 1996	
		Prüfer Mason, W	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 1503 (3.11.1994) (PM/CU)

EP 0 759 553 A1



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 96 11 3118

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE		
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch
A	US-A-5 269 891 (COLIN FERNAND J G) 14. Dezember 1993 * Spalte 3, Zeile 55 - Spalte 5, Zeile 20; Ansprüche 16, 27 * * Spalte 9, Zeile 60 - Spalte 10, Zeile 60 * * Spalte 14, Zeile 20 - Zeile 55 * * Spalte 20, Zeile 20 - Zeile 35 *	1-11
A	EP-A-0 447 288 (ESA INC) 18. September 1991 * Spalte 4, Zeile 20 - Spalte 5, Zeile 25; Abbildung 2 *	1-11
		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 6)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
MÜNCHEN	23. Oktober 1996	Mason, W
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund Q : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		

EPO FORM 1503 (01.82) (PACED)